

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **2002-238559**

(43)Date of publication of application : **27.08.2002**

(51)Int.Cl.

G12N 15/09

A01K 67/027

G12N 5/10

(21)Application number : **2001-039689**

(71)Applicant : **NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE
RESEARCH INST**

(22)Date of filing : **16.02.2001**

(72)Inventor : **MURAMATSU TATSUO**

(54) METHOD FOR PRODUCING EXTRANEIOUS GENE-EXPRESSED PRODUCT IN EGG OF BIRD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing an extraneous gene-expressed product in an egg of a bird, particularly chicken.

SOLUTION: This method comprises the following practice: an extraneous gene is transferred into the fallopian tube mucosal cell of a bird by electroporation technique and expressed therein, the resulting expressed product is then secreted and transferred into the albumen, thereby obtaining an egg accumulated with the expressed product.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-238559
(P2002-238559A)

(43) 公開日 平成14年8月27日 (2002.8.27)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027		C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 6 j
C 1 2 N 5/10		5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2001-39689(P2001-39689)

(22) 出願日 平成13年2月16日 (2001.2.16)

(71) 出願人 598091860

財団法人名古屋産業科学研究所
愛知県名古屋市中区栄二丁目10番19号

(72) 発明者 村松 達夫

愛知県豊橋市大岩町字北田60-2

(74) 代理人 100114362

弁理士 萩野 幹治

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA05 AA20 BA08

CA02 DA02 GA14

4B065 AA90X AA93Y AB01 AC15

BA03 CA24 CA32 CA44

(54) 【発明の名称】 鳥類の卵内で外来遺伝子発現産物を生産する方法

(57) 【要約】

【課題】 鳥類、特にニワトリの卵内で外来遺伝子発現産物を生産する方法を提供する。

【解決手段】 エレクトロポレーション法により、外来遺伝子を鳥類の卵管粘膜部細胞に導入し、卵管粘膜部細胞内で発現させる。発現産物を分泌させて卵白へと移行させ、発現産物が蓄積した卵を得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のステップを含んでなる、鳥類の卵内で外来遺伝子発現産物を生産する方法

- a) エレクトロポレーション法により、外来遺伝子を鳥類の卵管粘膜部細胞に導入するステップ、
- b) 導入された前記外来遺伝子を前記卵管粘膜部細胞内で発現させるステップ、
- c) ステップb) で得られた前記外来遺伝子の発現産物を、前記卵管粘膜部細胞から分泌させて卵白内に移行させるステップ。

【請求項2】 前記エレクトロポレーション法を、印加電圧が25V～250Vの範囲にあるパルスを用いて行う、ことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記エレクトロポレーション法を、パルス幅が20 msec～150 msecの範囲にあるパルスを用いて行う、ことを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 前記エレクトロポレーション法を、パルス回数が、2回～10回の範囲の条件で行う、ことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 前記ステップa)において、前記外来遺伝子の発現効率を上昇させる作用のある物質を、前記外来遺伝子とともに前記卵管粘膜部細胞に導入する、ことを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 前記鳥類が、ニワトリ又はウズラである、ことを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 前記鳥類がニワトリである、ことを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 前記外来遺伝子が、ヒトエリスロポエチン遺伝子、ヒトフィブリノーゲン遺伝子、ヒト血清アルブミン遺伝子、ヒトラクトフェリン遺伝子、ヒトプロテインC、及びヒト α -グルコシダーゼ遺伝子からなる群より選択される遺伝子である、ことを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 請求項1～8のいずれかに記載の方法により生産される、前記外来遺伝子発現産物を含む鳥類の卵。

【請求項10】 請求項9に記載の卵から得られる前記外来遺伝子発現産物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、鳥類の卵内で外来遺伝子発現産物を生産する方法に関する。本発明は、医薬品等として用いられる組換えタンパク質の生産に利用することができる。

【0002】

【従来の技術】 医薬品、研究材料等として有用な組換えタンパク質を、動物の生体を利用して生産する試みがなされている。その一つとして、トランスジェニックアニ

マルを利用した方法がある。この方法では、発生段階で遺伝子操作を行うことにより、ゲノム内に外来遺伝子が組込まれた動物（トランスジェニックアニマル）を作出し、これを用いて組換えタンパク質の生産を行う。外来遺伝子は、特定の細胞（組織）において発現するように予め組込まれ、当該細胞（組織）において組換えタンパク質が産生される。分泌系の細胞（組織）で発現するように外来遺伝子を組込めば、当該細胞（組織）の分泌機能を利用して組換えタンパク質を生体外へと取り出すことができる。例えば、乳腺組織で発現可能に外来遺伝子を組込むことにより、乳内に組換えタンパク質を生産することが可能なトランスジェニックヒツジやトランスジェニックウシを作出したという報告がある。

【0003】 一方、トランスジェニックアニマルを利用するのではなく、動物の成体に対して遺伝子導入を行い組換えタンパク質を生産する方法がある。例えば、産卵を開始した鳥類に外来遺伝子を導入し、卵内に組換えタンパク質を蓄積させる方法の開発が検討されている。鳥類では、卵管の内壁を形成する卵管粘膜細胞より分泌されたタンパク質等の成分により、卵白の形成が行われる。したがって、外来遺伝子を卵管粘膜細胞内に導入して発現させ、発現産物を卵管内に分泌させることができれば、外来遺伝子発現産物である組換えタンパク質を卵白内に蓄積させることができる。即ち、卵内で組換えタンパク質を生産することが可能となる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者は、鳥類の卵内で外来遺伝子発現産物を生産するシステムの構築を目指して研究を行い、先の特許出願（特願平8-95178号）において、産卵を開始したニワトリの卵管粘膜部細胞に外来遺伝子を導入し、当該細胞内で外来遺伝子を発現させることができたことを報告した。しかしながら、外来遺伝子の発現産物を卵管粘膜細胞から分泌させ、卵内に移行させることには成功していなかった。即ち、鳥類の卵内において外来遺伝子発現産物を生産するシステムを構築するには至っていなかった。そこで、本発明は、鳥類、特にニワトリの卵内で外来遺伝子発現産物を生産する方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者は上記目的に鑑み研究を重ねた。その結果、ニワトリ卵管粘膜部細胞内で産生された組換えタンパク質を細胞外へと分泌させ、最終的に卵内に移行させることができ、本発明を完成するに至った。本発明の構成は次の通りである。

〔1〕 以下のステップを含んでなる、鳥類の卵内で外来遺伝子発現産物を生産する方法

- a) エレクトロポレーション法により、外来遺伝子を鳥類の卵管粘膜部細胞に導入するステップ、
- b) 導入された前記外来遺伝子を前記卵管粘膜部細胞内で発現させるステップ、

c)ステップb)で得られた前記外来遺伝子の発現産物を、前記卵管粘膜部細胞から分泌させて卵白内に移行させるステップ。

〔2〕 前記エレクトロポレーション法を、印加電圧25V～250Vの範囲にあるパルスを用いて行う、ことを特徴とする〔1〕に記載の方法。

〔3〕 前記エレクトロポレーション法を、パルス幅が20msec～150msecの範囲にあるパルスを用いて行う、ことを特徴とする〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

〔4〕 前記エレクトロポレーション法を、パルス回数が2回～10回の範囲の条件で行う、ことを特徴とする〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の方法。

〔5〕 前記ステップa)において、前記外来遺伝子の発現効率を上昇させる作用のある物質を、前記外来遺伝子とともに前記卵管粘膜部細胞に導入する、ことを特徴とする〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

〔6〕 前記鳥類が、ニワトリ又はウズラである、ことを特徴とする〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

〔7〕 前記鳥類がニワトリである、ことを特徴とする〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

〔8〕 前記外来遺伝子が、ヒトエリスロポエチン遺伝子、ヒトフィブリノーゲン遺伝子、ヒト血清アルブミン遺伝子、ヒトラクトフェリン遺伝子、ヒトプロテインC、及びヒト α -グルコシダーゼ遺伝子からなる群より選択される遺伝子である、ことを特徴とする〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法。

〔9〕 〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の方法により生産される、前記外来遺伝子発現産物を含む鳥類の卵。

〔10〕 〔9〕に記載の卵から得られる前記外来遺伝子発現産物。

【0006】本発明の方法では、遺伝子導入後数日で外来遺伝子発現産物が蓄積された卵を得ることができる。即ち、上記トランスジェニックアニマルを利用する方法に比較して、極めて短時間で所望の組換えタンパク質を生産することが可能である。また、本発明の方法は、動物の有効利用の観点からも好ましいものである。即ち、現状では、外来遺伝子を適切に組込んだトランスジェニックアニマルの作出効率は低く、目的とする組換えタンパク質の生産に利用できない個体を無用に発生させてしまう。これに対して、本発明の方法では、遺伝子導入が適切に行われなかったことが判明した場合には、再度同一の個体に対して遺伝子導入を行い組換えタンパク質の生産を試みることができる。したがって、仮に遺伝子導入が成功しない場合であっても別の個体を発生させる必要がない。一方、本発明の方法では、染色体に組込まれない状態で外来遺伝子を導入することができる。このように導入された外来遺伝子は一過的に発現され、その結果、一定期間のみ所望の組換えタンパク質を卵内に蓄積させることができる。このことから、間隔を空けて複数の外来遺伝子を導入すれば、同一の個体を用いて複数種

類の組換えタンパク質を生産することが可能となる。したがって、医薬品の開発等のように、複数種類の組換えタンパク質を試験的に生産する必要がある場合において本発明の方法を好適に用いることができる。即ち、本発明の方法は、単に組換えタンパク質の生産方法としてだけでなく、組換えタンパク質のスクリーニングアッセイの一手段としても用いることができる。また、トランスジェニックアニマルではゲノム内に外来遺伝子が組込まれるため、意図しない組織において外来遺伝子が発現し、個体の生体機能に悪影響を及ぼすことが考えられるが、本発明の方法では、特定の細胞（組織）にのみ外来遺伝子を導入してこれを発現させるため、このような惧れがない。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明は、a)エレクトロポレーション法により、外来遺伝子を鳥類の卵管粘膜部細胞に導入するステップ、b)導入された前記外来遺伝子を前記卵管粘膜部細胞内で発現させるステップ、c)ステップb)で得られた前記外来遺伝子の発現産物を、前記卵管粘膜部細胞から分泌させて卵白内に移行させるステップを含んでなる、鳥類の卵内で外来遺伝子発現産物を生産する方法である。本発明における鳥類は特に限定されるものではなく、例えば、ニワトリ、ウズラ、アヒル、ガチョウ、七面鳥等である。生産効率の観点からいえば、多産かつ飼育が容易なものを採用することが好ましく、例えばニワトリ、ウズラを用いることが好ましい。特に、ニワトリを用いることが好ましい。ニワトリの中でも入手が容易であって、より多産かつ飼育が容易な系統（例えば、単冠白色レグホン種）を用いることが好ましい。

【0008】外来遺伝子とは、それが導入される鳥類自体の遺伝子以外の遺伝子をいう。したがって、種の異なる遺伝子（例えば、ヒト、ウシ、豚等の遺伝子）が含まれることは勿論のこと、同種の遺伝子（例えば、他の鳥類の遺伝子）をも含む意味である。好ましくは、ヒトの遺伝子である。ヒトの遺伝子を用いることにより、ヒトの生体内に存在するタンパク質と同等の機能を有する組換えタンパク質を生産することができる。ヒトの遺伝子としては、ヒトエリスロポエチン遺伝子、ヒトフィブリノーゲン遺伝子、ヒト血清アルブミン遺伝子、ヒトラクトフェリン遺伝子、ヒトプロテインC、ヒト α -グルコシダーゼ遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、ヒトのタンパク質と同等の機能を有するタンパク質を他の種が有する場合には、当該他の種のタンパク質をコードする遺伝子を外来遺伝子として用いることも好ましい。

【0009】尚、天然に存在する遺伝子に限らず、天然の遺伝子の塩基配列を一部改変したDNA又は周知ないし公知の技術により合成したDNAを、本発明における外来遺伝子として用いることができる。一本鎖DNA、二本鎖DNA、また、線状、環状の形状の外来遺伝子を用いること

ができる。

【0010】外来遺伝子は、鳥類の卵管粘膜部細胞に導入された後、卵管粘膜部細胞内で発現するような形態に調製される。即ち、卵管粘膜部細胞内での発現に適したプロモーター配列の下流域に外来遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）が存在するように調製することができる。このようなプロモーターとしては、鳥類の卵管粘膜細胞内での発現に適していればよく、例えば、SV40のプロモーター、鳥類の卵管粘膜細胞内で産生されるタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター等が用いられる。特に、鳥類の卵管粘膜部細胞内での転写効率の高いプロモーターを選択することが好ましい。プロモーターと併せてエンハンサーを用いることもできる。エンハンサーを用いることにより、外来遺伝子の転写効率を上昇させることが可能である。エンハンサーはプロモーターとの組合せを考慮して適当なものが選択される。例えば、SV40のプロモーターに組み合わせてSV40のエンハンサーを用いる。

【0011】外来遺伝子を卵管粘膜部細胞に導入する際、外来遺伝子の発現効率を上昇させる作用のある物質を併せて導入することが好ましい。発現産物の生産効率を向上させるためである。例えば、mRNAの翻訳を阻害する分子の活性を抑制する作用のある物質を用いることができる。このような物質としては、mRNAの翻訳を阻害する酵素の活性を抑制することで知られるアデノウイルスVI RNA遺伝子、アデノウイルスVII RNA遺伝子を用いることができる。これらの遺伝子は、適当なベクターに組込んだ状態で卵管細胞内に共導入することができる。また、シグナルペプチドをN末端側に有する組換えタンパク質が得られるように、予めシグナルペプチドをコードする配列を外来遺伝子に連結しておくこともできる。

【0012】上記のように調製した外来遺伝子を、インジェクション等により卵管粘膜部細胞の周囲に存在させる。この状態でエレクトロポレーション法を行い、外来遺伝子を卵管粘膜部細胞に導入する。エレクトロポレーション法は、電圧を瞬間的に印加することにより細胞膜に一時的に微小な孔（pore）をあけ、当該孔を介して細胞内へと遺伝子を導入する方法であって（Molecular Cloning, Third Edition, 16.33, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York等）、大量の細胞に対して同時に遺伝子導入を行うことができる。エレクトロポレーション法の基本的な操作は、周知の方法に従って行うことができる。エレクトロポレーション法の条件（印加電圧、パルス幅、パルス回数等）は、遺伝子導入効率及び鳥類への負担（ストレス）を考慮して設定される。例えば、印加電圧が、25V～250Vの範囲にあるパルスを用いることが好ましい。50V～200Vの範囲にあるパルスを用いることがさらに好ましい。パルス幅については、20 msec～150 msecの範囲にあるパルスを用いることが好ましく、さらに好ましくは、パルス幅5

0 msec～100 msecのパルスを用いる。尚、トータルパルス時間を400 msec～800 msecの範囲とすることが好ましい。電圧を印加する回数、即ちパルス回数については、2回～10回の範囲が好ましい。さらに好ましくは、4回～6回の範囲である。電極としては、ピンセット型のものを用いることができる。また、平板状、メッシュ状（網状）の電極を用いることもできる。

【0013】エレクトロポレーション法により導入された外来遺伝子は、卵管粘膜部細胞の核内に取り込まれ、その後一過的に発現する。外来遺伝子の形態（設計）如何によっては、外来遺伝子を卵管粘膜部細胞のゲノム内に組込ませることができ、この場合には長期間に渡って外来遺伝子を発現させることができる。続いて、発現産物を卵管粘膜部細胞から分泌させる。発現産物の分泌は、卵管粘膜部細胞の備える分泌機構を利用して行われる。分泌された発現産物は、卵白内に移行し卵内に蓄積される。以上の方法により、外来遺伝子発現産物（組換えタンパク質）が蓄積された卵が得られる。この卵を回収し、周知の分離、精製方法により、外来遺伝子発現産物を得ることができる。尚、上記の方法により生産される外来遺伝子発現産物を含む鳥類の卵、及び当該卵から分離、精製された外来遺伝子発現産物も本発明に含まれるものである。

【0014】

【実施例】以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。

〔エレクトロポレーション法の条件検討〕ニワトリ卵管粘膜部細胞への遺伝子導入効率を高めるために、遺伝子導入条件を検討した。

【0015】(1)エレクトロポレーションにおける印加電圧の検討

まず、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を組込んだベクター（pmiwluc）を、DNA濃度10 μ g、5mM CaCl₂、145mM NaClとなるようにCaCl₂及びNaClを含むバッファー50 μ lに溶解してDNA溶液を調製した。図1に、pmiwlucの構成を模式的に示した。pmiwlucは、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に β -アクチンエンハンサー、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、及び β -アクチンプロモーターを有し、下流にはlucZターミネータ配列を有するベクターである。尚、pmiwlucは、論文（Muramatsu et al. (1997) Muramatsu et al. (1997) Biochemical and Biophysical Research Communications, 233: 45-49.）に記載の方法に従い作製した。

【0016】次に、産卵鶏（17～18ヶ月齢の単冠白色レグホン）をエーテル麻酔下開腹して卵管を露出させた。続いて、卵管膨大部を切開して卵管粘膜部を暴露した。次に、注射筒を用いて上記DNA溶液を粘膜部に注入した。DNAの注入量は、一羽当たり10 μ gとした。DNA溶液注入後、直ちにDNA溶液注入部をピンセット型電極で挟み、エレクトロポレーターを用いてエレクトロポレー

ションを行った。印加する電圧の違いにより3群に分け、各群所定の印加電圧(25V、50V、及び75V)のパルスを用いてエレクトロポレーションを行った。印加電圧以外の条件は各群同一とした(矩形直流パルス、パルス幅100msec、パルス回数6回)。図2は、以上の操作を模式的に示した図である。エレクトロポレーション後24時間経過したところで、遺伝子導入を行った卵管粘膜部を摘出し、ホモゲナイザーで細胞を粉碎した。続いて、ホモジェネートを遠心分離し、得られた上清を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性の測定は次のように行った。まず、上記の上清にBuffer A (Pothier et al. (1992) DNA Cell Biol., 11:83-90) を3倍量加えて希釈した後20 μ lを採取し、その中に発光基質(20mMトリシン(和光純薬工業、大阪)、1.07mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂5H₂O(Aldrich, Chem. Co.)、2.67mM MgSO₄(和光純薬工業、大阪)、0.1mM EDTA、33.3mM DTT、270 μ M Co-A(オリエンタル酵母)、470 μ M D-ルシフェリンナトリウム(和光純薬工業、大阪)、530 μ M ATP(和光純薬工業、大阪))100 μ lを加えた。そして、ルミノメータ(Auto Lumat, LB933, Berthod, Germany)を用いて蛍光発光を10秒間隔で1分間測定した。

【0017】図3のグラフに、各群のルシフェラーゼ活性を測定した結果をまとめた。グラフより、75Vの印加電圧を用いてエレクトロポレーションを行うことにより、高い効率で遺伝子導入できることがわかった。

【0018】(2) pAdVantageベクター共導入の検討
次に、pAdVantageベクター(Promega社製、Madison, WI 53711-5399 USA)を用いて遺伝子導入効率の向上を試みた。図4は、pAdVantageを模式的に示した図である。pAdVantageベクターは、アデノウイルスVA I-RNA遺伝子、アデノウイルスVA II-RNA遺伝子を有し、mRNAからタンパク質への翻訳を阻害する機構に作用してこれを抑制する。

【0019】まず、上記と同様の方法により、pmiwluc及びpAdVantageを溶解したDNA溶液(pmiwluc濃度10 μ g、pAdVantage濃度5 μ g、5mM CaCl₂、145mM NaCl)50 μ lを調製した。次に、上記と同様の方法で、産卵鶏(17~18ヶ月齢の単冠白色レグホン)の卵管粘膜部に、DNA溶液の注入及びエレクトロポレーションを行った。DNAの注入量は、一羽当たりpmiwluc及びpAdVantageをそれぞれ10 μ g及び5 μ gとした。また、エレクトロポレーションの条件は、印加電圧75V、パルス幅100msec、パルス回数6回とした。尚、対照として、pmiwlucのみを含むDNA溶液を注入(DAN量10 μ g)してエレクトロポレーションを行った群(luc群)、及びpmiwlucを注入してエレクトロポレーションを行った群(control群)を用いた。

【0020】エレクトロポレーション後24時間経過したところで、遺伝子導入を行った卵管粘膜部を摘出してルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性の

測定は上記と同様の方法で行った。測定結果を図5に示した。図5のグラフにおいて、AdV+Luc、Luc、及びcontrolは、それぞれ、pmiwluc及びpAdVantageを共導入した群、pmiwlucのみ導入した群、及びcontrolの群を表す。グラフから明らかなように、pAdVantageベクターを共導入することにより、ルシフェラーゼ遺伝子の導入効率が顕著に上昇した。

【0021】[産卵鶏の卵内での組換えタンパク質の生産]

(1) 卵管粘膜部細胞への遺伝子導入

以下の手順により、ニワトリ卵管粘膜部細胞にヒトアルカリフォスファターゼ遺伝子(SEAP)を導入した。発現ベクターとして、ヒトアルカリフォスファターゼ遺伝子を組込んだpSEAPcontrol(Clontech Laboratories, Palo Alto, CA 94303-4230 USA)を用いた。図6にpSEAPcontrolの構成を模式的に示した。pSEAPは、ヒトアルカリフォスファターゼ遺伝子(SEAP)の上流にSV40プロモーターを有し、さらに、SV40ポリA配列及びSV40エンハンサーを有する。まず、pSEAP controlとpAdVantageを、pSEAP control濃度150 μ g、pAdVantage濃度10 μ g、5mM CaCl₂、145mM NaClとなるようにCaCl₂及びNaClを含むバッファー200 μ lに溶解し、DNA溶液を調製した。次に、これまでの卵管粘膜部への注入とは異なり、膨大部の切開による卵管粘膜の暴露は避け、直接漿膜下の粘膜層へ数カ所にわたって広い範囲でDNA溶液を注射した。この処置によって産卵低下への影響を軽減した。その後、直ちにエレクトロポレーションを行った。DNAの注入量は、一羽当たりpSEAP control及びpAdVantageをそれぞれ150 μ g及び10 μ gとした。また、エレクトロポレーションの条件は、矩形直流パルス、印加電圧75V、パルス幅100msec、パルス回数6回とした。エレクトロポレーション後、直ちに切開部を縫合した。

【0022】(2) 組換えタンパク質発現の確認

エレクトロポレーション後の一定時間ごとにそれぞれ4羽のニワトリよりDNA注入部(卵管粘膜部細胞)を摘出し、当該部のヒトフォスファターゼ(SEAP)活性を測定した。併せて、産み落とされた卵から卵白を回収し、卵白中のヒトフォスファターゼ活性を測定した。

【0023】図7に測定結果をまとめたグラフを示した。グラフ中、横軸はエレクトロポレーション後の経過日数、縦軸はヒトフォスファターゼ活性(SEAP Activity)である。DNA注入部(卵管粘膜部細胞)では、エレクトロポレーション後1~4日経過した時点でSEAP活性が認められ、ヒトフォスファターゼ遺伝子が発現しているのがわかる。また、エレクトロポレーション後6日~7日経過した時点で産卵された卵の卵白中にもSEAP活性が認められる。

【0024】これらの結果から、導入されたSEAP遺伝子がエレクトロポレーション後1~4日の間に卵管細胞内で発現し、その後、発現産物であるSEAPが当該細胞より

分泌されて卵白内に移行し、エレクトロポレーション後6～7日経過後に産卵された卵内に蓄積したものと予想された。このように、エレクトロポレーション法を用いて卵管粘膜部に遺伝子導入を行うことにより、外来遺伝子であるヒトアルカリフォスファターゼ遺伝子(SEAP)が卵管粘膜部で発現し、発現産物が卵内に蓄積されることが確認された。

【0025】この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

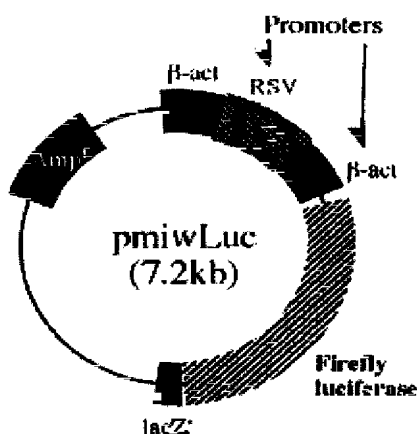
【0026】

【発明の効果】本発明により、鳥類、特にニワトリの卵内で外来遺伝子発現産物を生産することが可能となる。本発明を利用することにより、鳥類の卵内において外来遺伝子発現産物を生産するシステムを構築することが可能となり、このシステムによれば、トランスジェニックアニマルを用いた方法に比較して、極めて短時間で所望の組換えタンパク質を生産することができる。また、本発明では繰り返し同一の個体に対して遺伝子導入を行うことができるので、動物の有効利用の観点からも本発明は好ましいものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、pmiwlucの構成を模式的に示した図である。pmiwlucは、ホタルルシフェラーゼ遺伝子(Firefly luciferase)の上流に β -アクチンエンハンサー(β -act)、RSV(ラウス肉腫ウイルス)プロモーター(RSV)、及び β -アクチンプロモーター(β -act)を有し、下流にはlucZターミネータ配列(lucZ)を有する

【図1】



ベクターである。

【図2】図2は、実施例における、ニワトリ卵管粘膜部細胞への遺伝子導入操作を模式的に示した図である。

【図3】図3は、エレクトロポレーション法における印加電圧の相違による遺伝子導入効率の変化を示す図である。印加電圧をそれぞれ25V、50V、75Vで行った場合のルシフェラーゼ活性(Luciferase Activity)が示される。

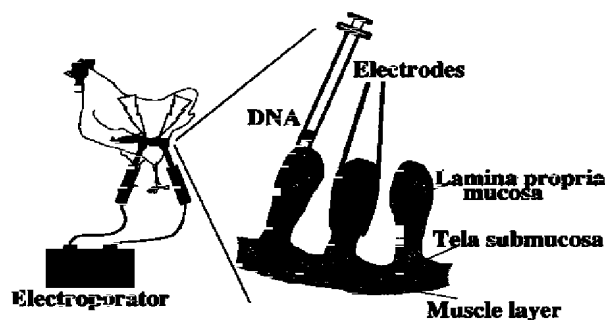
【図4】図4は、pAdVantageベクターの構成を模式的に示した図である。pAdVantageベクターは、アデノウイルスVA I-RNA遺伝子(Adenovirus VAI RNA gene)、アデノウイルスVA II-RNA遺伝子(Adenovirus VAII RNA gene)を有する。

【図5】図5は、pAdVantageベクターを共導入した場合の効果を示す図である。pmiwluc及びpAdVantageを共導入した群(AdV+Luc)、pmiwlucのみ導入した群(Luc)、及びpmiwlucを導入した群(control)のルシフェラーゼ活性(Luciferase Activity)が示される。

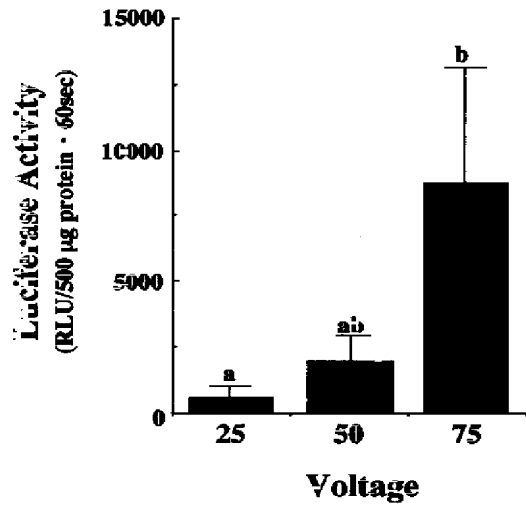
【図6】図6は、pSEAP controlの構成を模式的に示す図である。pSEAPは、ヒトアルカリフォスファターゼ遺伝子(SEAP)の上流にSV40プロモーター(SV40 promoter)を有し、さらに、SV40ポリA配列(SV40 polyA)及びSV40エンハンサー(SV40 enhancer)を有する。

【図7】図7は、エレクトロポレーション後の卵管粘膜部(Oviduct)及び卵白(Egg White)におけるヒトアルカリフォスファターゼ遺伝子(SEAP)の発現を示す図である。グラフ中、横軸はエレクトロポレーション後の経過日数、縦軸はヒトフォスファターゼ活性(SEAP Activity)である。

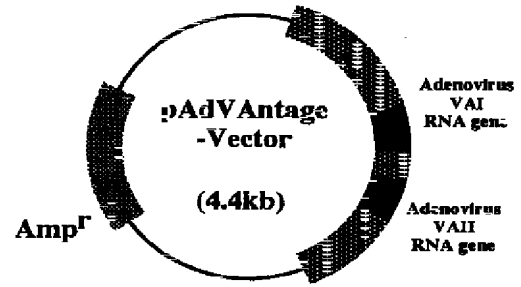
【図2】



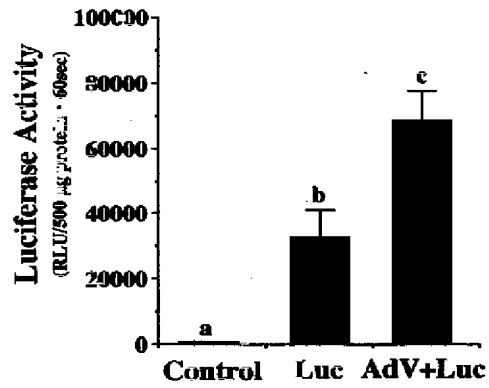
【図3】



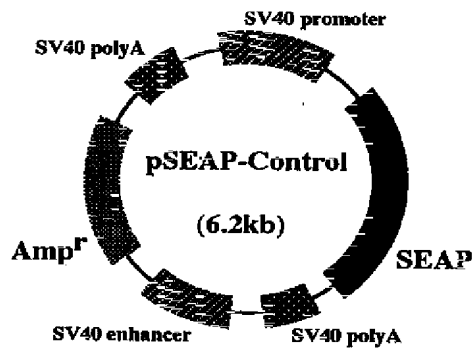
【図4】



【図5】



【図6】



【図7】

